©2024 筑波大学生物学類

# トネリコ類立枯病菌の胞子発芽を抑制する *Aureobasidium pullulans* の セイヨウトネリコ生葉上での挙動

皿海　琉（筑波大学 生物学類）　　指導教員：岡根　泉（筑波大学 生命環境系）

【背景と目的】

近年、ヨーロッパにおいて“Ash dieback”というトネリコ属植物に立枯れ症状を引き起こす樹木病害が広く発生しており問題となっている。

この“Ash dieback”の原因菌である *Hymenoscyphus fraxineus* に感染しても“Ash dieback”が発病しない北海道大学札幌キャンパス内で生育するセイヨウトネリコの個体について内生菌相の調査が行われ *Aureobasidium pullulans* が分離された。この *A. pullulans* は、*H. fraxineus* の子嚢胞子の発芽を抑制することが報告されており生物防除剤としての活用が期待されている。

本研究では、セイヨウトネリコ上での *A. pullulans* の挙動を明らかにすることを目的として、本菌をセイヨウトネリコ生葉に接種および再分離試験を行うことで、本菌の宿主組織内外での定着の状態と、生葉上での挙動をズーム式顕微鏡（実体顕微鏡）と卓上顕微鏡 Miniscope（簡易 SEM）で観察した。

【材料と方法】

(1) 供試植物および供試菌株

供試植物として北海道大学で採取、移送され本研究室で維持してきたセイヨウトネリコの若木を使用した。供試菌株として市村 (2021) によって北海道大学に生育するセイヨウトネリコ生葉から内生として分離された *A. pullulans* No.5029 を供試した。

(2) *Aureobasidium pullulans* の再分離試験

*Aureobasidium pullulans* の懸濁液を接種したセイヨウトネリコの小葉（図 1）を 3 日、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間後に採取し、無処理葉の葉面を寒天培地上に押しつけた後、剥がすことで葉面菌の分離を試みた。その後、本葉を表面殺菌した後に切り出した葉片を寒天培地上において培養し、伸長してきた菌体をさらに分離培養して *A. pullulans* の生息を確認した。

(3) *Aureobasidium pullulans* の継時的観察

14×10 cm の角形プラスチックシャーレ内で 40ppm のジベレリン溶液を与えながらで維持したセイヨウトネリコの小葉の切り葉上に（図 2）、*A. pullulans* 懸濁液を滴下し、1 週間継時的に実体顕微鏡または簡易 SEM で *A. pullulans* の細胞を観察した。

【結果および考察】

(1) *A. pullulans* の再分離試験

接種後 3 日～4 週間後の表面殺菌をしていない小葉の葉面からは *A. pullulans* が分離された。一方で、表面殺菌後の小葉からは *A. pullulans* は分離されなかった。今回の条件では *A. pullulans* はセイヨウトネリコから内生菌としては分離されなかったが、葉面上で 3～4 週間ほど生存できることが確認された。

(2) *A. pullulans* の継時的観察

実体顕微鏡による観察では時間が経過しても *A. pullulans* の細胞は生葉上で増殖する様子は観察されなかった。一方で、簡易 SEM による観察では時間が経つにつれて *A. pullulans* の酵母状細胞の出芽増殖と菌糸状の増殖の様子が確認された。また、酵母状細胞で増殖し小葉上でバイオフィルム状に定着していることを示唆させる様子も観察された（図 3）。

【まとめ】

*Aureobasidium pullulans* はセイヨウトネリコ生葉上で少なくとも 3～4 週間生存する可能性が強く示唆された。葉面上では菌糸を伸長させ、また、バイオフィルム状に定着する様子が観察されたことにより、葉面上で菌糸状細胞や酵母状細胞など様々な形態で生存している可能性が示唆された。本菌はセイヨウトネリコから内生的に分離されたものであるが、今回の条件では内生菌として分離されなかった。葉表面上の定着形態によっては葉組織内に定着する可能性があるため、今後の調査が必要である。



図 1　セイヨウトネリコへの *A. pullulans* の接種方法

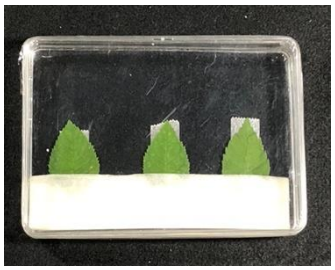


図 2　角形シャーレにおける切り葉の維持方法

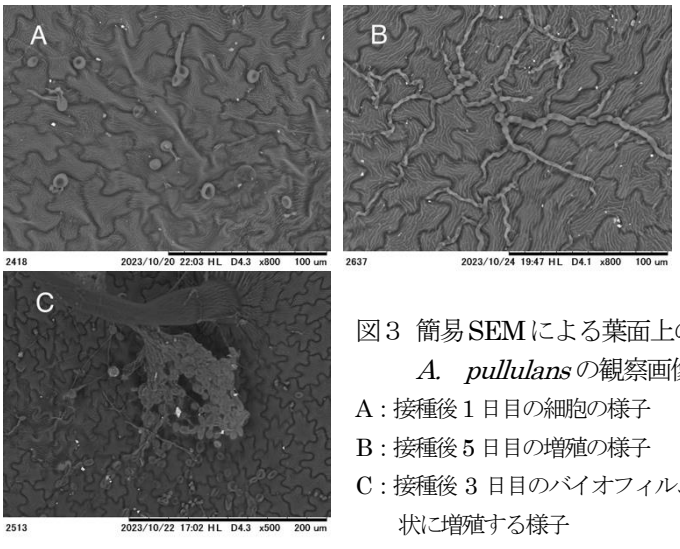



図 3　簡易 SEM による葉面上の *A. pullulans* の観察画像
A：接種後 1 日目の細胞の様子
B：接種後 5 日目の増殖の様子
C：接種後 3 日目のバイオフィルム状に増殖する様子